

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 8 月 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 3 3 8 0 8
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 3 3 8 0 8]

出 願 人
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

REC'D 26 SEP 2003

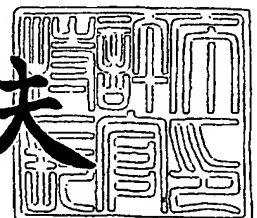
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 9 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1778
【提出日】 平成14年 8月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 31/00

A61K 35/78
A61K 31/216
A61K 31/12
A61P 3/08
A23L 1/00
A23L 2/00
A23K 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 榎 竜嗣

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 大野木 宏

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 杉山 勝美

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 小川 衣子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社
社内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社
社内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 302019245

【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社

【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 173212

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 セリ科植物由来物質を有効成分として含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤。

【請求項 2】 セリ科植物がアシタバである請求項 1 記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 3】 カルコン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤。

【請求項 4】 カルコン類化合物がキサントアンゲロールである請求項 3 記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 5】 セリ科植物由来物質を有効成分として含有することを特徴とするインスリン様作用剤。

【請求項 6】 セリ科植物がアシタバである請求項 5 記載のインスリン様作用剤。

【請求項 7】 カルコン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするインスリン様作用剤。

【請求項 8】 カルコン類化合物がキサントアンゲロールである請求項 7 記載のインスリン様作用剤。

【請求項 9】 セリ科植物由来物質を含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料。

【請求項 10】 セリ科植物がアシタバである請求項 9 記載の食品、飲料又は飼料

【請求項 11】 カルコン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料。

【請求項 12】 カルコン類化合物がキサントアンゲロールである請求項 11 記載の食品、飲料又は飼料。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、生体内でインスリンが関連する疾病、例えば糖尿病や肥満症等の治療または予防に有用な医薬、食品、飲料又は飼料に関する。

【0002】**【従来の技術】**

インスリンは、哺乳動物の正常な炭水化物、タンパク質、及び脂肪代謝に必要なホルモンである。I型糖尿病のヒトは、生命を支えるホルモンであるインスリンを十分産生しないので、生存のために外部からのインスリン投与を必要とする。対照的に、II型糖尿病のヒトは生存のために外部からのインスリン投与は必要としない。しかし、II型糖尿病のヒトの多くは、時間が経つに連れてインスリン産生が減少し、適切な血液グルコース量制御のために、インスリンを補充することが必要となる。また、II型糖尿病のヒトの中でも、高インスリン血症やインスリン受容体異常によりおこるインスリン抵抗性が要因の糖尿病患者については、インスリンを投与しても治療効果は見られない。

【0003】

近年、インスリンの副作用や上記の問題を解決するため、インスリンと同様の生理機能を有する物質（以下、インスリン様物質と称することがある）の開発が行われてきており、合成のベンゾキノン誘導体がインスリン様物質であること（国際公開第99/51225号パンフレット）、またシコン（紫根）由来のシコニンがインスリン様物質であること（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 292, P642-651, (2002)）が判明している。これらのようなインスリン様物質は、I型糖尿病患者だけでなく、II型糖尿病患者、さらにはインスリン抵抗性が要因のII型糖尿病患者についても、インスリンと同様の生理活性を示すことによる症状の改善が期待されている。

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、天然物由来で安全で、簡便に摂取可能な、食品素材、医薬品素材として適したインスリン様作用を有する物質を開発し、当該組成物もしくは物質を用いた、医薬、食品、飲料または飼料を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

以下、本発明を概説すれば、本発明の第1、第3、第5の発明は、セリ科植物由来物質を有効成分として含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤、インスリン様作用剤、ならびにインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に関する。本発明の第1、第3、第5の発明において、セリ科植物としては、アシタバが好適に使用される。

【0006】

本発明の第2、第4、第6の発明は、カルコン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤、インスリン様作用剤、ならびにインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に関する。本発明の第2、第4、第6の発明において、カルコン類化合物としては、キサントアンゲロールが例示される。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明において、セリ科植物とは、被子植物類セリ科に属する植物であって、例えばアシタバ、セリ、ミツバ、シシウド、ニンジン、セロリ、パセリ等が例示される。本発明においては、セリ科の大型多年生草本であるアシタバが特に好適に使用できる。また、本発明に使用されるセリ科植物は、特に限定はないが、果実、種子、種皮、花、葉、茎、根、根茎及び／又は植物体そのままを使用することができる。

【0008】

本発明において、セリ科植物由来物質としてはセリ科植物由来処理物が例示される。処理物としては、インスリン様作用を有していれば特に限定はないが、例えば抽出物、粉碎物、搾汁、破碎物、化学処理物、酵素処理物をいい、特に好適

には抽出物、粉碎物および搾汁が例示される。本発明の有効成分として使用されるものであれば特に限定はない。

【0009】

なお、本発明においてインスリン様作用とは、インスリンと同等の生理活性を示すものであれば特に限定はなく、例えば、糖、アミノ酸の取り込み促進、グリコーゲン、タンパク質合成及び分解抑制などの代謝調節作用が例示される。また、インスリン様作用の有無については、後述の実施例 4 に記載の方法により簡便に測定することができる。

【0010】

本発明において、抽出物とは抽出溶媒を用いて抽出操作を行う工程を経て得られる物質のことをいう。抽出は、公知の抽出方法により以下のように行うことができる。例えば原料を粉碎もしくは細断した後、溶媒を用いてバッチ式もしくは連続式で行うことができる。抽出物を得る際の抽出溶媒としては、特に限定はないが、水、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を挙げることができ、所望により単独で、もしくは適宜混合液として用いることができる。抽出溶媒の量は適宜決定すればよいが、通常、原料に対し、好ましくは 0.1～100 倍量の抽出溶媒を使用すれば良い。抽出温度も適宜、目的に応じて決定すればよいが、水抽出の場合は通常、好ましくは 4～130℃、より好ましくは 25～100℃である。また、溶媒中にエタノールが含まれる場合は 4～60℃の範囲が好適である。抽出時間も、抽出効率を考慮し決定すればよいが、通常、好ましくは数秒～数日、より好ましくは 5 分～24 時間の範囲となるように、原料、抽出溶媒、抽出温度を設定するのが好適である。抽出操作は、たとえば、攪拌しながら又は静置して行えばよく、また、必要に応じて数回繰り返してもよい。以上の操作により、セリ科植物由来の抽出物（以下、本発明の抽出物と称することがある。）として得られる。抽出物は必要に応じ、ろ過、遠心分離、濃縮、限外ろ過、分子ふるい等の処理を行い、目的のインスリン様作用物質が濃縮された抽出物を調製することができる。抽出物や濃縮抽出物のインスリン様作用は、後述の実施例 4 に記載の方法に

より簡便に測定することができる。また、セリ科植物を公知の方法で茶葉状にし、これを用いた抽出物もインスリン様作用を有していれば、本発明の抽出物として使用することができる。また、これらの抽出物を2種以上含有させて使用することもできる。なお、本発明においては異なった抽出法で得られた抽出物を2種以上含有させて使用することもできる。

【0011】

また、本発明においては、セリ科植物由来の抽出物を公知の方法で分画することによって得られる画分や、分画操作を複数回繰り返すことにより得られる画分についても本発明の抽出物に包含される。上記の分画手段としては、抽出、分別沈殿、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等が挙げられる。得られた画分の精製を、インスリン様作用を指標としてさらに進めることにより、インスリン様作用物質を単離することもできる。

【0012】

また、セリ科植物由来の抽出物以外の、セリ科植物由来処理物の製造方法としては、例えば植物を乾燥させ、粉碎することで粉状のセリ科植物由来の粉碎物を得ることができる。

【0013】

また、セリ科植物由来の搾汁の製造方法としては、公知の植物の搾汁方法であれば特に限定はないが、例えばスクリー式、ギア式、カッター式等の搾り機やジュースーを用いて搾汁することができる。また、前処理として細断あるいはすりつぶして、上述のジュースー又は布等で絞って搾汁を得ることもできる。

【0014】

本発明において、セリ科植物由来物質の形状としては、インスリン様作用を有していれば特に限定はないが、粉状、固形状、液状のいずれの形状であってもよい。また、当該物質を公知の方法で造粒して粒状の固形物として、本発明のセリ科植物由来物質として使用することができる。造粒方法としては、特に限定はないが、転動造粒、攪拌造粒、流動層造粒、気流造粒、押出し造粒、圧縮成型造粒、解砕造粒、噴射造粒又は噴霧造粒等が例示される。粉状の当該セリ科植物由来物質を液体、例えば水やアルコール等に溶解して液状とし、本発明のセリ科植物

由来物質として使用することもできる。

【0015】

本発明において、カルコン類化合物としては、カルコン骨格を有する化合物であれば特に限定はなく、例えばキサントアンゲロールが例示される。カルコン類化合物については、NGF産生増強作用等、さまざまな生理活性を有することが知られているが（国際公開第01/54682号パンフレット）、インスリン様作用を有することは本発明において初めて明らかにされたものである。

【0016】

カルコン類化合物としては、市販の化合物を利用できるほか、植物から常法にしたがって抽出し、精製することにより得ることができる。例えば、前述したセリ科植物由来の抽出物から各種クロマトグラフィー等により分画し、精製することにより得ることができる。

【0017】

すなわち、例えばアシタバからキサントアンゲロールを精製する場合は、アシタバ根部から酢酸エチルを溶媒として抽出を行い、逆相クロマトグラフィーにより分画し、キサントアンゲロールを精製することができる。

【0018】

また、本発明に使用されるカルコン類化合物の塩としては薬理学的に許容される塩が好ましい。また、後述するようにプロドラッグとして機能し得る当該化合物の誘導体であってもよい。従って、本発明に係るカルコン類化合物とは、本発明の所望の効果が得られ得る限り、その誘導体ならびにそれらの塩も包含するものである。また、カルコン類化合物の光学異性体、ケト-エノール互変異性体、幾何異性体などの各種異性体、各異性体の単離されたものであっても、インスリン様作用を有する限り、全て本発明において使用することができる。

【0019】

さらに、カルコン類化合物は、例えばエステルなど、体内で容易に加水分解し、所望の効果を発揮し得る誘導体（プロドラッグ）を形成可能である。かかるプロドラッグの調製は公知の方法に従えばよい。なお、かかる誘導体は、それらの塩であってもよい。

【0020】

本発明で使用される塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基との塩などが例示される。かかる塩としては薬理学的に許容される塩が好ましい。なお、本発明において使用される薬理学的に許容される塩とは生物に対して実質的に無毒であって、かつインスリン様作用を有する化合物の塩を意味する。当該塩としては、たとえば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムまたはプロトン化されたベンザチン（N，N'－ジベンジルエチレンジアミン）、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグラミン（N－メチルグルカミン）、ベネタミン（N－ベンジルフェネチルアミン）、ピペラジンもしくはトロメタミン（2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1，3－プロパンジオール）との塩が挙げられる。

【0021】

本発明におけるセリ科植物由来物質は、植物体そのものと比較してインスリン様作用物質、例えばカルコン類を高濃度及び／又は高純度に含有するものが特に好ましい。ここで高濃度とは、原料である植物体の単位重量あたりのインスリン様作用物質重量よりもセリ科植物由来物質の単位重量あたりのインスリン様作用物質重量の方が多いことを意味する。また、高純度とは、原料である植物と比較して当該物質のインスリン様作用物質の含有率が高いことを意味する。

【0022】

また、本発明はセリ科植物由来物質もしくはカルコン類化合物を高濃度及び／又は高純度に含有する食品、飲料又は飼料を提供するが、これは従来の食品、飲料又は飼料と比べて、本発明の食品、飲料又は飼料中にインスリン様作用物質が高濃度及び／又は高純度に含有されていることを意味する。

【0023】

なお、本発明において、セリ科植物由来物質及びカルコン類化合物を本発明の有効成分と称し、本発明の有効成分を含有するインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤を本発明の治療剤又は予防剤と称することがある。

【0024】

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、

副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切に疾患の治療又は予防を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の治療剤、予防剤、食品、飲料または飼料は、インスリン応答に関与する疾患の治療または予防に有効である。

【0025】

また、本発明において、インスリン応答に関与する疾患としては、インスリンレベルの変化、インスリン受容体によるインスリンもしくはインスリン受容体の活性のレベルの変化、インスリン受容体の下流シグナルの異常、及びそれらの組み合わせから選択される因子によって特徴づけられる疾患が挙げられ、例えば、糖尿病、肥満症、高血圧、コカイン禁断症状、鬱血性心不全、記憶増強、心臓血管痙攣、大脳血管痙攣、クロム親和性細胞腫、神経節神経芽腫、ハンチントン病が例示される。糖尿病としては、I型糖尿病、II型糖尿病のいずれもが例示される。また、II型糖尿病としては、インスリンを投与しても治療効果の見られないようなインスリン抵抗性が要因の疾患についても包含される。

【0026】

インスリンは脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導を促進することが知られており、また成熟した脂肪細胞ではグルコースを取り込み、細胞内にトリグリセリドが蓄積されることが知られている（J. Biol. Chem., Vol. 253, No. 20, P7570~7578（1978年））。すなわち、この方法を利用して、インスリンの代わりに被験物質を投与し、脂肪細胞への分化や細胞中のトリグリセリド量を測定することで、被験物質のインスリン様作用を測定することができる。

【0027】

本発明の治療剤または予防剤としては、本発明に係る前記有効成分を公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬学的に許容され得る塩を用いる。

【0028】

本発明の治療剤または予防剤の製造は、通常、前記有効成分を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分

散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

【0029】

医薬用担体は、治療剤または予防剤の投与形態および剤型に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤とする場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、たとえば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などが利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などを配合することもできる。たとえば、錠剤または丸剤とする場合は、所望によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの糖衣または胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤とする場合は、薬理学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などとすることができ、たとえば、精製水、エタノールなどが担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。

【0030】

一方、非経口剤とする場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

【0031】

外用剤としては、経皮投与用または経粘膜（口腔内、鼻腔内）投与用の、固体、半固体状または液状の製剤が含まれる。また、座剤なども含まれる。たとえば、乳剤、ローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などの液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤

などの経皮投与用または経粘膜投与用の貼付剤などとすることができる。

【0 0 3 2】

以上の各種製剤は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる製剤における有効成分の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。

【0 0 3 3】

本発明の治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用および注射によることができる。注射剤は、たとえば静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用剤では、たとえば、座剤をその適する投与方法により投与すればよい。

【0 0 3 4】

本発明の治療剤または予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的および当該治療剤または予防剤の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。一般には、製剤中に含有される前記有効成分の投与量で、好ましくは成人1日当り $0.1 \mu\text{g} \sim 1 \text{g} / \text{kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行ってもよい。また、本発明の治療剤または予防剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0 0 3 5】

また、本発明は前記有効成分を含むインスリン様作用剤を提供することもできる。当該インスリン様作用剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬理学的に許容される塩が好適である。インスリン様作用剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。かかるインスリン様作用剤における前記有効成分の含有

量は、当該インスリン様作用剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。また、該インスリン様作用剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得るようであれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。インスリン様作用剤は、インスリン応答に関与する疾患において有用である。また、当該インスリン様作用剤はインスリン応答に関与する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該インスリン様作用剤は、インスリンによる細胞の物理的変化に関する機能研究にも有用である。

【0036】

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切にインスリン様作用を発現することができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の医薬、食品、飲料または飼料は、インスリン応答に関与する疾患の治療または予防に有効である。

【0037】

また、本発明は、前記有効成分を含有、添加および／または希釈してなるインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料を提供する。本発明の態様においては、有効成分の塩としては、薬学的に許容される塩、またはそれと同等の安全性を有する塩が好適である。本発明の食品、飲料または飼料は、そのインスリン様作用により、インスリン応答に関与する疾患の症状改善、予防に極めて有用である。

【0038】

なお、本明細書において、「含有」とは食品、飲料または飼料中に本発明で使用する有効成分が含まれるという態様を、「添加」とは食品、飲料または飼料の原料に、本発明で使用する有効成分を添加するという態様を、「希釈」とは本発明で使用する有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

【0039】

本発明の食品、飲料または飼料の製造法に特に限定はない。たとえば、配合、調理、加工などは一般の食品、飲料または飼料のものに従えばよく、それらの製造法により製造することができ、得られた食品、飲料または飼料にインスリン様作用を有する本発明に係る前記有効成分が含有されていれば良い。

【0040】

本発明の食品または飲料としては特に限定はないが、たとえば、本発明に係る前記有効成分が含有されてなる、穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅など）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシングなど）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆など）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージなど）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮など）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリームなど）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料など）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類など）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュールなど）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料など）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりんなど）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥または濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープなど）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテルなど）、固形食品、液体食品（スープなど）、香辛料類などの農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品などが挙げられる。



【0041】

本発明の食品または飲料には前記有効成分が単独もしくは複数含有、添加および／または希釈されており、そのインスリン様作用を発現するための必要量が含まれていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

【0042】

また、本発明の飲料については、本発明の有効成分と、セリ科以外の植物、例えば野菜や果実等の搾汁液と混合もしくはセリ科植物と同時に同時に搾汁して健康飲料とすることもできる。例えば、アシタバの搾汁液を水で希釈したり、ニンジン、小松菜、カブ、チンゲンサイ、トマト、ミカン、レモン、グレープフルーツ、キウイ、ほうれん草、ラディッシュ、大根、白菜、キャベツ、サラダ菜、レタス、ニラ、オクラ、ピーマン、キュウリ、インゲン、えだまめ、エンドウ、トウモロコシ、ニンニク、ルッコラ、ビワ、夏みかん、甘夏等の搾汁液、牛乳、豆乳等と混合してインスリン様作用を有する健康飲料とすることができる。

【0043】

本発明の食品又は飲料中の前記有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と活性発現の観点から適宜選択できるが、例えば食品100重量%当たり好ましくは0.00001重量%以上、より好ましくは0.0001～10重量%、更に好適には0.0006～6重量部%であり、例えば、飲料100重量%当たり好ましくは0.00001重量%以上、より好ましくは0.0001～10重量%、更に好適には0.0006～6重量%である。また本発明の食品又は飲料は、好ましくは、それらに含有される有効成分が、例えば成人1日当たり0.001～100mg/kg、好ましくは0.1～10mg/kgとなるように摂取すればよい。

【0044】

また、本発明は、前記有効成分を含有、添加および／または希釈してなる、インスリン様作用を有する生物用の飼料を提供するものであり、さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特

徴とする生物飼育用剤が提供される。

【0045】

これらの発明において、生物とはたとえば養殖動物、ペット動物などであり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類または貝類が例示される。飼料としては体調の維持および／または改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

【0046】

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分のインスリン様作用に基づき、本発明の前記治療剤または予防剤によるのと同様の効果の発現が期待できる。すなわち、当該生物におけるインスリン応答に関与する疾患の治療または予防効果を有する。

【0047】

本発明に使用される前記有効成分は通常、対象生物の体重 1 kg、1 日当たり好ましくは 0.01～2000 mg 投与される。投与は、たとえば、当該有効成分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加混合することで行うことができる。また、前記有効成分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、0.001～15 重量%の割合が好適である。

【0048】

本発明の飼料の製造法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中にインスリン様作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。

【0049】

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられ、広く適用できる。

【0050】

インスリン様作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させること、またはインスリン様作用を有する本発明に使用される前記有効成分の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、ペット動物などの体調を良好に維持し、または、改善させたりすることができる。

【0051】

本発明で使用される前記有効成分は、その作用発現にとっての有効量の投与を行っても毒性は認められない。たとえば経口投与の場合、アシタバのエタノール抽出物、キサントアンゲロールもしくはこの光学活性体又はそれらの塩のいずれかを 1 g/k g でマウスに単回投与しても死亡例は認められない。また、前記有効成分は、ラットに経口投与において 1 g/k g を経口単回投与しても死亡例は認められない。

【0052】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

【0053】

実施例1 アシタバ根抽出物の調製

(1) アシタバ (*Angelica Keiskei Koidz.*) 根部を凍結乾燥後、細かく粉碎したもの 10 g に 100 ml のクロロホルムを加え、室温で30分間抽出を行った。吸引ろ過後、残渣について同じ操作を繰り返した。これらのクロロホルム抽出液を合わせて、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、乾固物を 2.5 ml のジメチルスルホキシドに溶解してアシタバ根クロロホルム抽出物を調製した。

【0054】

(2) 実施例1-(1)のクロロホルム抽出後残渣に 100 ml のエタノールを加え、室温で30分間抽出を行った。吸引ろ過後、残渣について同じ操作を繰り返した。エタノール抽出液を合わせて、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、乾固物を 2.5 ml のジメチルスルホキシドに溶解してアシタバ根エタノール

ル抽出物を調製した。

【0055】

実施例2 アシタバ根抽出物の分画

乾燥アシタバ (*Angelica Keiskei Koidz.*) 根部粉末 5.8 kg に 24 リットルの酢酸エチルを加え、室温で 3 時間抽出を行い、吸引ろ過後、酢酸エチル抽出液と残渣に分けた。得られた酢酸エチル抽出液 200 ml について、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、クロロホルムに溶解し、シリカクロマトを用いて分画した。以下にその条件について示す。シリカゲルには BW-300SP (富士シリシア化学社製: 100 ml) を用いた。クロロホルム (500 ml)、クロロホルム: メタノール = 100:1 (300 ml)、酢酸エチル (200 ml) の順に溶出を行った。溶出液は画分 1 (280 ml)、画分 2 (200 ml)、画分 3 (280 ml)、画分 4 (240 ml) の順に分画、回収し、それぞれ減圧濃縮、乾固の後、2 ml のエタノールに溶解し、シリカカラム分画フラクション 1~4 を得た。

【0056】

実施例3 キサントアンゲロールの調製

(1) 実施例2記載のシリカカラム分画フラクション3 (1 ml) を減圧濃縮の後、100 ml の 40% エタノール水溶液に溶解し、逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。樹脂はコスモシル 140 C18-OPN (ナカライテスク社製: 樹脂量 20 ml) を用いた。それぞれ 100 ml の 40% エタノール水溶液、50% エタノール水溶液、60% エタノール水溶液、100% エタノールの順に溶出を行い、それぞれ 40% エタノール水溶液溶出画分、50% エタノール水溶液溶出画分、60% エタノール水溶液溶出画分、100% エタノール溶出画分を得た。

【0057】

(2) 実施例3-(1) で得た 50% エタノール水溶液溶出画分を 4℃ にて静置し、生成した結晶をろ過分別する事で化合物 A を得た。化合物 A の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302: 日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 m/z

393 (M+H)⁺のピークを検出した。つぎに化合物Aを核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500: 日本電子社製) を用い、¹H-NMR を測定した。以下にNMRの帰属の信号を示す。

【0058】

¹H-NMR: δ 1.58(3H, s, 7"-CH₃), 1.66(3H, s, 8"-CH₃), 1.81(3H, s, 3"-CH₃), 2.08(4H, m, 4"-Hおよび5"-H), 3.48(2H, d, J=7.0Hz, 1"-H), 5.04(1H, m, 6"-H), 5.29(1H, m, 2"-H), 6.40(1H, d, J=9.0 Hz, 5'-H), 6.86(2H, d, J=9.0 Hz, 3-Hおよび5-H), 7.45(1H, d, J=15.0 Hz, α -H), 7.54(2H, d, 2-Hおよび6-H), 7.71(1H, d, 6'-H), 7.82(1H, d, β -H), 13.8(1H, s, 2'-OH)

【0059】

以上、化合物Aについて行ったMSスペクトル、NMRスペクトル解析の結果、化合物Aはキサントアンゲロール (分子量392) であることが確定した。

【0060】

実施例4 明日葉根抽出物による脂肪細胞への分化誘導

(1) 脂肪細胞への分化誘導

脂肪細胞への分化誘導はRubinらの方法 (J. Biol. Chem. 255 7570-7578, (1978)) を一部改良して行った。200 μ M アスコルビン酸を含む10%ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製, 12-604F) (以下A-D-MEM培地) に前駆脂肪細胞株3T3-L1 (ATCC CCL-92.1) を4 \times 10⁴ 個/mlになるように懸濁し、12穴マイクロタイタープレートのウェルに2mlずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で7日間培養した。なお、2, 4日目に同培地により培地交換を行った。7日目に、0.25 μ Mデキサメタゾンを含むA-D-MEM培地に交換後、実施例1-(1) で調製した50mg/ml アシタバ根クロロホルム抽出物あるいは実施例1-(2) で調製した36mg/mlのアシタバ根エタノール抽出物4 μ lを添加した。なお陽性対照として4 μ lの5mg/mlインスリン (タカラバイオ社製) 水溶液添加の区分を、陰性対照として水添加の区分を設定した。45時間後にA-D-MEM培地に交換し、各ウェルに4 μ lの50mg/ml アシタバ根クロロホルム抽出物あるいは3

6 mg/ml の明日葉根エタノール抽出物、陽性対照として 2 μ l の 5 mg/ml インスリン水溶液、陰性対照として水を添加し、さらに 7 日間培養した。なお、2、4 日目に培地を交換し、その際各ウェルに、4 μ l の 50 mg/ml アシタバ根クロロホルム抽出物あるいは 36 mg/ml のアシタバ根エタノール抽出物、陽性対照として 2 μ l の 5 mg/ml インスリン水溶液、陰性対照として水を添加した。

【0061】

(2) トリグリセリド生合成量の測定

成熟脂肪細胞への分化誘導の指標として、またインスリン様作用の評価として細胞中のトリグリセリドの量を測定した。培養終了後、培地を除き、リン酸緩衝塩溶液で 2 回細胞を洗浄し、1 ml のヘキサン：イソプロパノール = 3 : 2 の溶媒を添加して 30 分間室温に置いた後上清を回収した。この操作を再度繰り返し、得られた 2 ml の上清を濃縮乾固した。沈殿をイソプロパノールに溶解後、溶液中に含まれるトリグリセリドの量をトリグリセライド G-テスト（和光純薬社製、code 276-69801）を用い測定した。また、測定は全て 2 連で行った。

【0062】

この結果、水添加区分と比較してアシタバ根クロロホルム抽出物あるいはアシタバ根エタノール抽出物においてインスリンを添加した区分と同様にトリグリセリド生合成の誘導が確認できた。すなわち、アシタバ根クロロホルム抽出物およびアシタバ根エタノール抽出物にインスリン様活性が認められた。これを図 1 に示す。図 1 は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 (μ g/ml) を示す。

【0063】

実施例 5 明日葉根抽出物分画フラクションによる脂肪細胞への分化誘導

実施例 2 によって調製した明日葉根抽出物の各フラクションのインスリン様活性を実施例 4 記載の方法に準じて測定した。サンプルとして 2.875 mg/ml シリカカラム分画フラクション 3 あるいは 10.825 mg/ml のシリカカラム分画フラクション 4 をそれぞれ 4 μ l 添加した。なお陽性対照として 4 μ

1 の 5 mg/ml インスリン水溶液添加の区分を、陰性対照として水添加の区分を設定した。この後、同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加 7 日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

【0064】

この結果、水区分と比較してシリカカラム分画フラクション 3 およびシリカカラム分画フラクション 4 においてインスリンを添加した区分と同様にトリグリセリド生合成の誘導が確認できた。すなわち、シリカカラム分画フラクション 3 およびシリカカラム分画フラクション 4 にインスリン様活性が認められた。これを図 2 に示す。図 2 は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ($\mu \text{ g/ml}$) を示す。

【0065】

実施例 6 キサントアンゲロールによる脂肪細胞への分化誘導

キサントアンゲロールのインスリン様活性を実施例 4 の方法に準じて測定した。すなわち、サンプルとして実施例 3 により調製した 12.5 mM のキサントアンゲロールのジメチルスルホキシド溶液、 8.34 mM のキサントアンゲロールのジメチルスルホキシド溶液、あるいは、 2.77 mM のキサントアンゲロールのジメチルスルホキシド溶液をそれぞれ $4 \mu \text{ l}$ ずつ添加した。なお陽性対照として $4 \mu \text{ l}$ の 5 mg/ml インスリン水溶液添加の区分を、陰性対照として水添加の区分を設定した。この後同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加 7 日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

【0066】

この結果、キサントアンゲロール添加区分において濃度依存的にトリグリセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、キサントアンゲロール添加区分にインスリン様活性が認められた。これを図 3 に示す。図 3 は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ($\mu \text{ g/ml}$) を示す。

【0067】

【発明の効果】

本発明により、セリ科植物由来物質又はカルコン類化合物を含有するインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の医薬、食品、飲料又は飼料が提供さ

れる。該医薬は糖尿病または肥満症等のインスリン応答に関与する疾患の治療剤又は予防剤として有用である。また、該食品又は飲料は、日常の飲食品として摂取することにより、インスリン応答に関与する疾患の症状改善等が可能となる。従って、セリ科植物由来物質又はカルコン類化合物を含有する機能性飲食品はそのインスリン様作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品である。また、本発明により、セリ科植物由来物質又はカルコン類化合物を含有するインスリン様作用剤も提供され、該インスリン様作用剤はインスリンの機能研究、インスリンに関連する疾患用医薬のスクリーニングに有用である。

【0068】

【図面の簡単な説明】

【図1】 アシタバ根抽出物により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

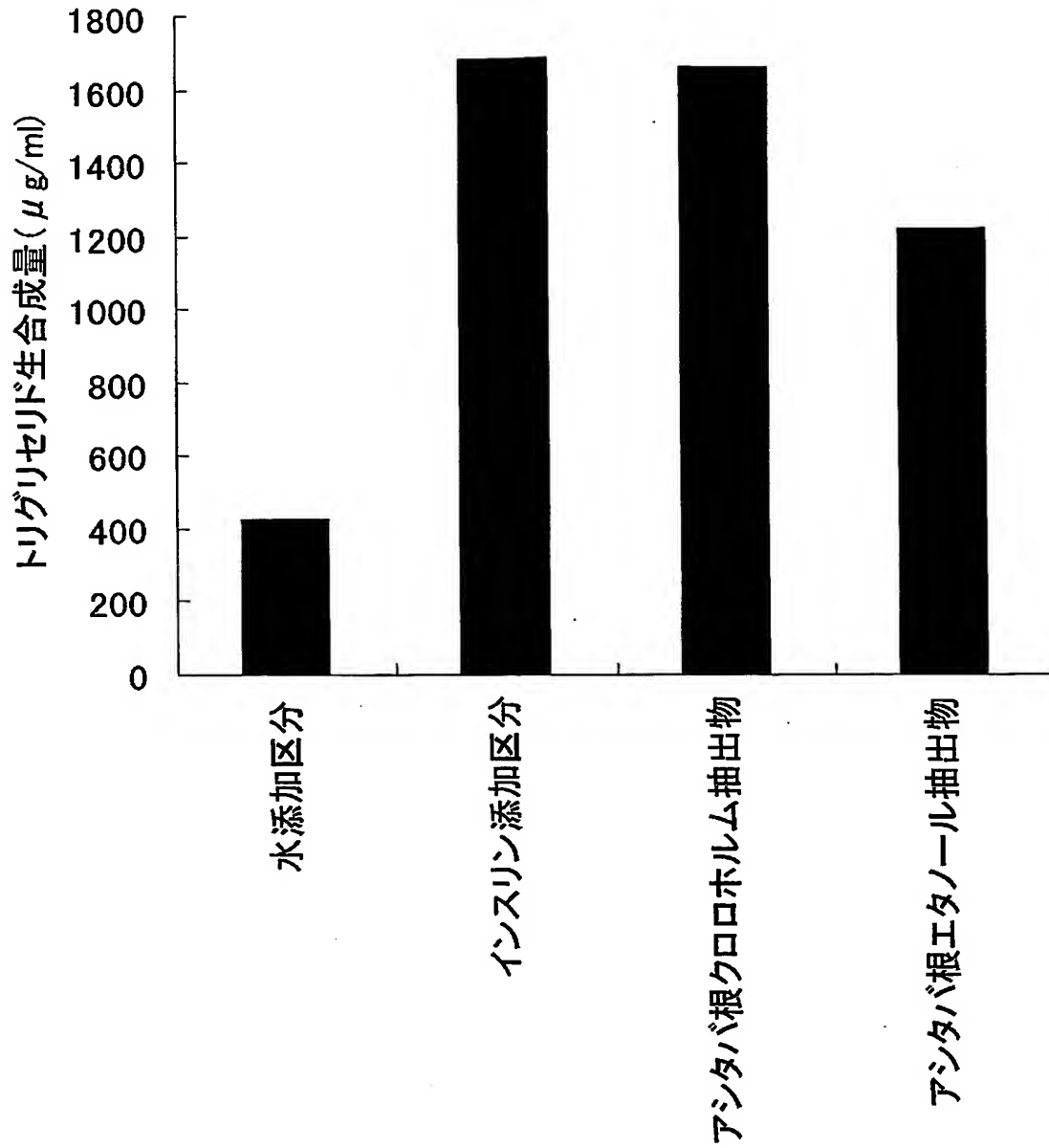
【図2】 アシタバ根部抽出物分画フラクション1～4により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

【図3】 キサントアングロールにより分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

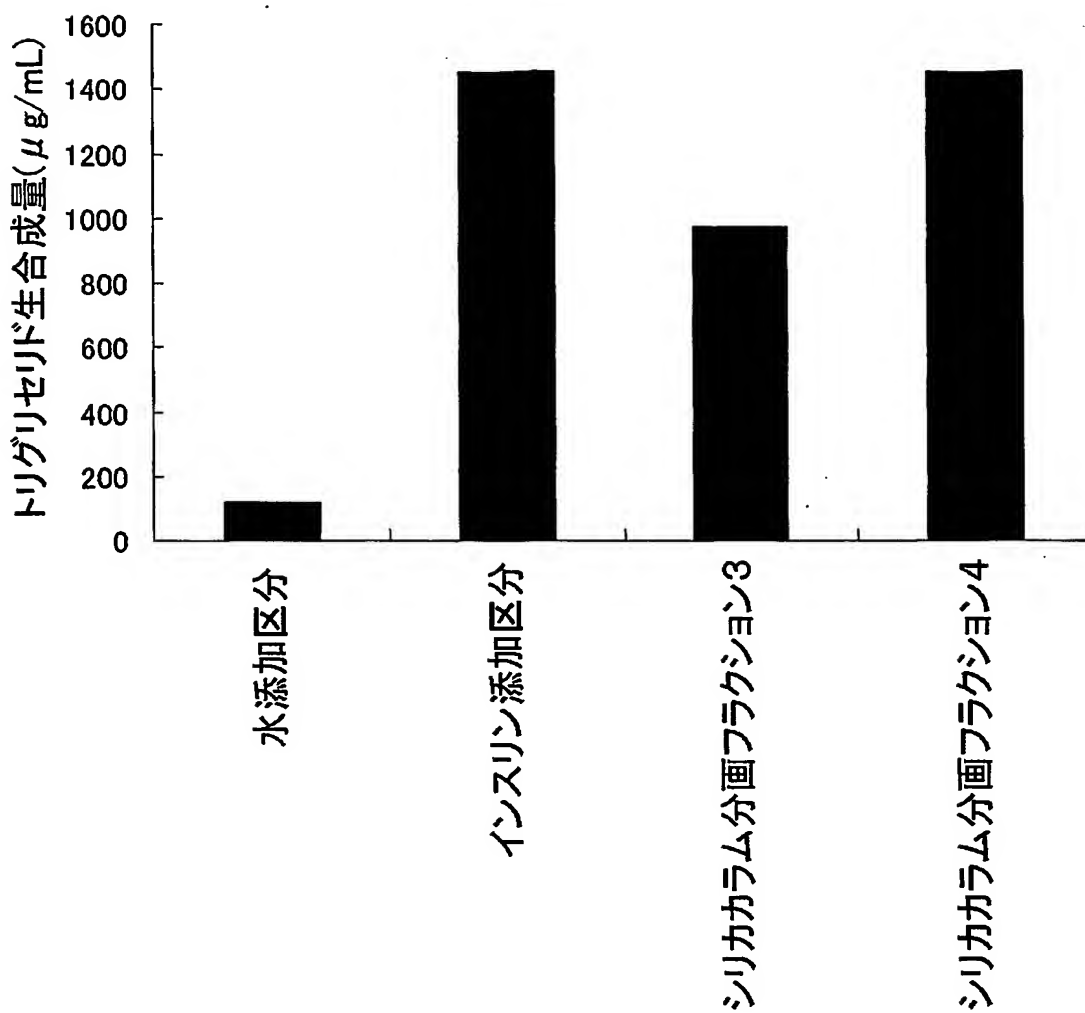
【書類名】

図面

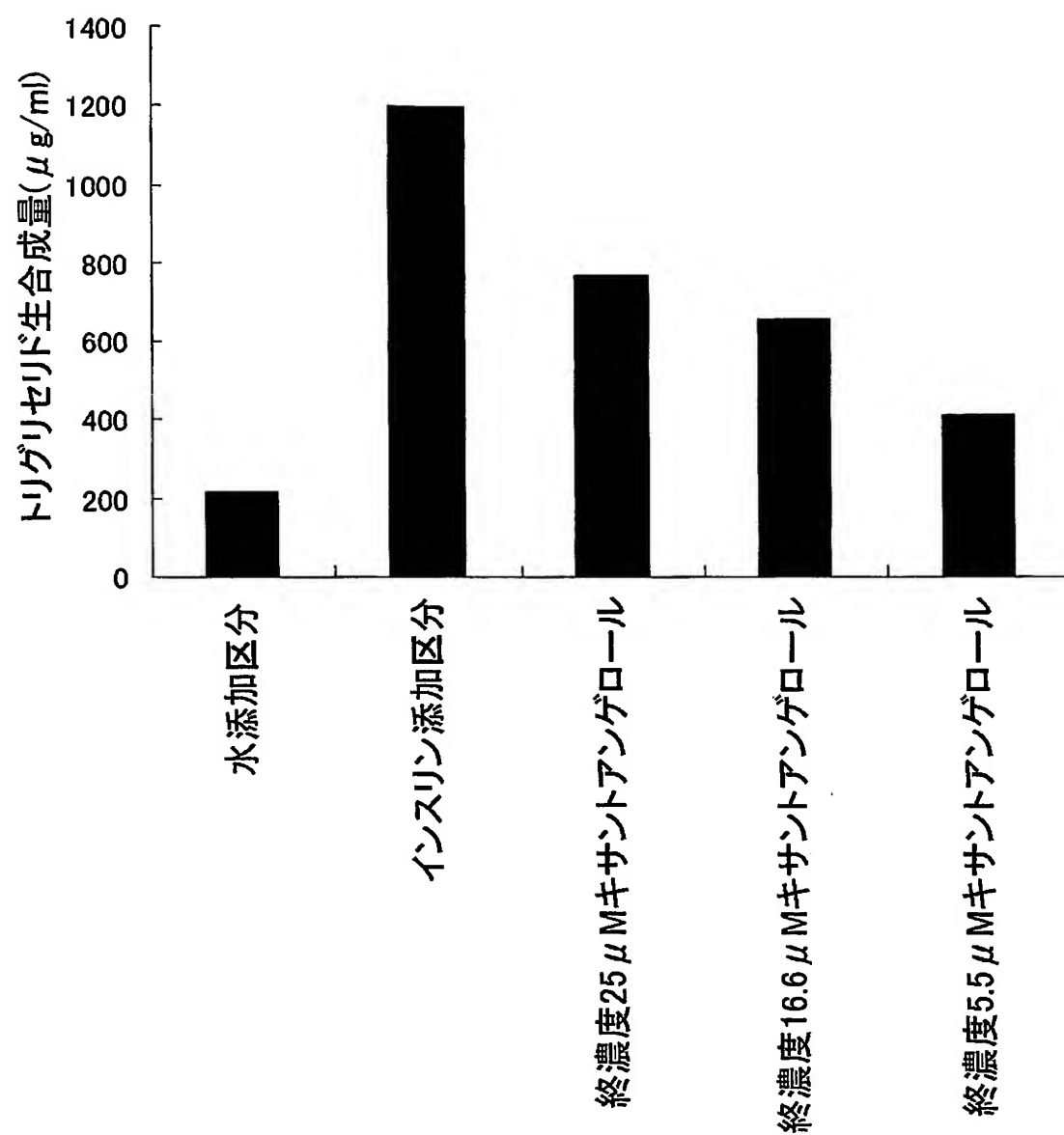
【図 1】



【図 2】



【図 3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

インスリンに感受性を示す疾患の治療用又は予防用の医薬、食品、飲料又は飼料を提供すること。

【解決手段】

セリ科植物由来物質もしくはカルコン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするインスリン応答に関与する疾患の治療用又は予防用の医薬、食品、飲料又は飼料を提供する。セリ科植物としては、例えばアシタバが例示される。またカルコン類化合物としてはキサントアンゲロールが例示される。

【選択図】 なし

特願 2002-233808

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名

タカラバイオ株式会社